



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E
CONSERVAÇÃO
MESTRADO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO



**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS HIDROCARBONETOS
MONOAROMÁTICOS BTX NO MICROCRUSTÁCEO MARINHO
*MYSIDOPSIS JUNIAE***

Meggie Karoline Silva Nascimento

Mestrado Acadêmico

São Cristóvão
Sergipe- Brasil
2017

MEGGIE KAROLINE SILVA NASCIMENTO

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS HIDROCARBONETOS
MONOAROMÁTICOS BTX NO MICROCRUSTÁCEO MARINHO
*MYSIDOPSIS JUNIAE***

Dissertação de mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ecologia e
Conservação da Universidade
Federal de Sergipe, como requisito
parcial para obtenção do título de
Mestre em Ecologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Jeanylle Nilin

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Susana
Loureiro

São Cristóvão
Sergipe - Brasil
2017

TERMO DE APROVAÇÃO

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS HIDROCARBONETOS
MONOAROMÁTICOS BTX NO MICROCRUSTÁCEO**

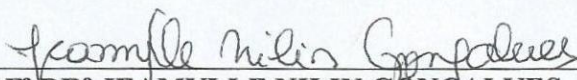
MARINHO *Mysidopsis juniae*

por

MEGGIE KAROLINE SILVA NASCIMENTO

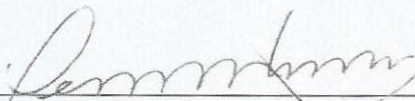
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Universidade Federal de Sergipe, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação.

APROVADA pela banca examinadora composta por



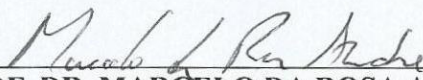
PROF^a DR^a JEAMYLLE NILIN GONÇALVES

Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da
Universidade Federal de Sergipe



PROF. DR. DENIS MOLEDO DE SOUZA ABESSA

Universidade Estadual Paulista/ UNESP



PROF. DR. MARCELO DA ROSA ALEXANDRE

Universidade Federal de Sergipe/ UFS

São Cristóvão/SE, 21 de fevereiro de 2017

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

N244a Nascimento, Meggie Karoline Silva.
Avaliação da toxicidade dos hidrocarbonetos monoaromáticos
BTX no microcrustáceo marinho *mysidopsis juniae* / Meggie
Karoline Silva Nascimento; orientadora Jeamylle Nilin. – São
Cristóvão, 2017.
45 f.: il.

Dissertação (mestrado em Ecologia e Conservação)–
Universidade Federal de Sergipe, 2017.

1. Ecologia marinha. 2. Toxicidade - Testes. 3. Benzenos –
Aspectos ambientais. 4. Tolueno – Aspectos ambientais. 5.
Crustáceo. 6. Toxicologia ambiental. I. Nilin, Jeamylle, orient. II.
Título.

CDU 574.64

AGRADECIMENTOS

No momento que encerro mais uma etapa em minha vida não poderia deixar de agradecer a todos que fizeram esse sonho ser possível. O resultado deste estudo passou pela ajuda, atenção, carinho e dedicação de cada um de vocês! Então lá vai...

À Deus, por ser minha força, meu refúgio e estar sempre ao meu lado.

Aos meus pais e minha família, por me ensinarem princípios e valores que não conseguiria aprender em nenhuma instituição de ensino e me incentivarem nesses dois anos.

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Jeanylle Nilin por todo aprendizado, dedicação, paciência e ajuda nesses anos juntas e pelas lições que levarei para toda vida.

A minha Coorientadora Prof^a. Dr^a. Susana Loureiro pela ajuda e horas cedidas a mim.

Aos membros da banca Prof. Dr. Denis Abessa e Prof. Dr. Marcelo Rosa pelas recomendações e ajuda no fechamento deste estudo.

Aos meus amados amigos do Laboratório de Estudos Ecotoxicológicos- LESE que fizeram parte dessa história ao meu lado: Bruno, Anderson, Vitor, Josi, Camila, Diana, Walkíria, Amanda, Édipo e Ádila. Vocês foram ÓTIMOS!

A todos meus companheiros/amigos lindos do mestrado: Ari, Lipe, Ranna e Camila pelo carinho, apoio e ajuda. A caminhada ficou mais fácil com vocês por perto.

A todos os mestres do Programa de Pós Graduação em Ecologia e Conservação- PPEC pelos ensinamentos e a Jú por toda dedicação.

A todos do Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos Poluentes – LCP, em especial ao Prof. Marcelo e ao Michel pela imensa ajuda nas análises cromatográficas.

Ao Laboratório de Bentos Costeiro – Labec pela disponibilidade e ajuda na realização dos experimentos

Ao meu querido Antonio Carlos que sempre me apoiou, enxugou os prantos e ajudou nos momentos que precisei.

As minhas amigas da vida: Thaís, Thamara, Pâmela, Cris, Sandra e Luciana por todo amor e por entenderem meus momentos de ausência.

A Universidade Federal de Sergipe, CAPES e CNPQ por tornarem possível a realização desse projeto.

E por fim, aos Mysis que foram peça fundamental e estrelas desse estudo.

OBRIGADA!

“Se não eu, quem? Se não agora, quando?”

Mikhail Gorbachev

RESUMO

Os compostos orgânicos voláteis benzeno, tolueno e os xilenos (BTX) estão entre os produtos químicos mais produzidos mundialmente e podem ser encontrados em diferentes compartimentos ambientais. A contaminação de ambientes aquáticos por essas substâncias pode acarretar em efeitos tóxicos adversos em organismos de diferentes organizações biológicas. Diante disso, o presente estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade dos BTX isolados e em misturas binárias por meio do teste de toxicidade aguda (96h) com o microcrustáceo *Mysidopsis juniae*. Para isso, os organismos foram expostos às concentrações de BTX a fim de identificar os efeitos na sobrevivência, assim como estudar os modos de ação das substâncias em mistura com a aplicação dos modelos teóricos de concentração de adição (CA) e ação independente (IA). Nos experimentos com os compostos isolados foi possível perceber que o xileno foi o mais tóxico ($CL_{50} 16,10 \pm 2,4 \text{mg.L}^{-1}$) seguido por tolueno ($CL_{50} 38 \pm 5,3 \text{mg.L}^{-1}$) e benzeno ($CL_{50} 78,03 \pm 2,9 \text{mg.L}^{-1}$). Quando em mistura binária foram observados desvios dos modelos de referência para CA em todos os experimentos realizados (razão das doses e antagonismo). Na exposição do xileno e benzeno o desvio que se enquadrou aos resultados foi o antagonismo, já a mistura de xileno e tolueno foi melhor explicada pelo desvio razão das doses onde a toxicidade foi causada principalmente pelo xileno, no experimento com o tolueno e benzeno também foi observado um padrão de razão das doses, sendo que nesse caso o benzeno foi o maior responsável pela toxicidade. Logo, os hidrocarbonetos analisados foram tóxicos para o misidáceo, tanto isolados como em misturas binárias, evidenciando a importância de estudos nessa temática que possam servir de suporte para avaliações e monitoramento dos ambientes marinhos, visto os riscos iminentes de contaminação deste meio e a ampla escala de utilização desses compostos.

Palavras-chave: benzeno, tolueno, xilenos, misidáceo, toxicidade de misturas.

ABSTRACT

The volatile organic compounds benzene, toluene and xylenes (BTX) are among the most produced chemicals worldwide and can be found in different environmental compartments. Contamination of aquatic environments by these substances may result in to adverse toxic effects on organisms of different biological organizations. The present study aimed to evaluate the toxicity of BTX isolated and in binary mixtures using the acute toxicity test (96h) with the microcrustacean *Mysidopsis juniae*. To achieve that, organisms were exposed to BTX concentrations in order to identify the effects on survival, as well as to study the modes of action of the substances in mixture with the application of the theoretical models of Addition Concentration (AC) and Independent Action (AI). In the experiments with the isolated compounds it was possible to notice that xylene was the most toxic compound ($LC_{50} 16,10 \pm 2,4 \text{mg.L}^{-1}$) followed by toluene ($LC_{50} 38 \pm 5,3 \text{mg.L}^{-1}$) and benzene ($LC_{50} 78,03 \pm 2,9 \text{mg.L}^{-1}$) respectively. When in binary mixture deviations of the reference models for CA were observed in all experiments performed (dose ratio and antagonism). In the exposure of xylene and benzene the deviation that fit the results was the antagonism, where as the mixture of xylene and toluene was better explained by the deviation dose ratio where the toxicity was caused mainly by xylene. In the experiment combining toluene and benzene, the dose ratio pattern was observed as well, and the benzene was the main responsible for the toxicity. We concluded that BTX were toxic to mysids, both isolated and in binary mixtures, evidencing the importance of studies in this subject that can serve as support for evaluations and monitoring of the marine environments, considering the imminent risks of contamination of this environment and the wide scale of use of these compounds.

Keywords: benzene, toluene, xylenes, mysid, toxicity of mixtures

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Misidáceo <i>Mysidopsis juniae</i> . A- indivíduo fêmea. B- indivíduo macho.....	17
Fig. 2. Aquários do cultivo dos misidáceos <i>Mysidopsis juniae</i>	18
Fig. 3. Combinações binárias em unidades tóxicas que serão utilizadas para avaliação do efeito da mistura.	20
Fig. 4. Carta controle para o misidáceo <i>Mysidopsis juniae</i> durante os meses de agosto de 2014 a dezembro de 2016 utilizando o sulfato de zinco.	23
Fig. 5. Efeito da sobrevivência de <i>Mysidopsis juniae</i> expostos a mistura binária de xileno e tolueno.	29
Fig. 6. Efeito da sobrevivência do <i>Mysidopsis juniae</i> expostos a mistura binária de tolueno e benzeno.	30
Fig. 7. Efeito da sobrevivência de <i>Mysidopsis juniae</i> expostos a mistura binária de xileno e benzeno.	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Interpretação dos parâmetros adicionais (a e b) que definem a função de desvio dos modelos conceituais de Concentração de Adição (CA) e Ação Independente (IA), adaptado de Jonker et al. (2005).	21
Tabela 2. Valores das concentrações reais para o tolueno, xileno e benzeno em três tempos de exposição (0, 24 e 96h) e concentração nominal.	24
Tabela 3. Concentração letal (CL ₅₀) dos BTX para o <i>Mysidopsis juniae</i> nos períodos de 24, 48 e 96h mais desvios-padrões.	25
Tabela 4. Valores de efeitos para os BTX em diferentes grupos de animais, calculadas em tempos de exposição distintos.	28

SUMÁRIO

1. Introdução	11
2. Objetivos.....	16
2.1. Geral.....	16
2.2. Específicos	16
3. Material e métodos	17
3.1. Reagentes	17
3.2. Manutenção e cultivo dos organismos-teste	17
3.3. Ensaio de toxicidade aguda	18
3.3.1. Substância de referência.....	18
3.3.2. Ensaio com substâncias isoladas	19
3.3.3. Ensaio com mistura binária	19
3.4. Análise de dados	19
3.5. Análise Química	22
4. Resultados e discussão	22
4.1. Substância de Referência	22
4.2. Análise Química	23
4.3. Ensaio com compostos isolados	24
4.5. Ensaio com misturas binárias	29
5. Conclusão	34
Referências bibliográficas	35

1. Introdução

Devido à demanda energética e as necessidades do mundo moderno, a extração, produção e o consumo do petróleo têm sido intensificados, e os impactos da utilização desse recurso mineral são cada vez mais evidentes. O petróleo é um combustível fóssil composto por uma mistura de hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos, enxofre, oxigênio, nitrogênio e metais em proporções variáveis (Kolesnikovas et al., 2009). Esses hidrocarbonetos são relativamente persistentes e apresentam alta lipofilicidade, gerando preocupação do ponto de vista ambiental (Shadi et al., 2012). Mesmo com as inovações tecnológicas no processo de extração, produção e transporte do petróleo bruto e seus derivados, a ocorrência de acidentes ainda é frequente, tornando-se uma ameaça potencial aos ambientes marinhos, uma vez que estas atividades são realizadas majoritariamente nesse ambiente. De acordo com os dados da *International Tanker Owners Pollution Federation Limited* (ITOPF, 2017) em 2016 aproximadamente 6.000 toneladas de petróleo foram despejados no mar em incidentes com navios petroleiros, sendo que o evento mais marcante foi registrado no Golfo do México (>700 toneladas).

No Brasil, aproximadamente 90% da produção de petróleo é realizada no mar por meio de plataformas *offshore* localizadas principalmente nos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo que detêm, aproximadamente, 68 e 15% do total produzido, respectivamente (ANP, 2017). Sendo assim, o risco de acidentes é eminente e os impactos recorrentes vão depender da quantidade do petróleo derramado, tipo do óleo, a localização do vazamento, vulnerabilidade dos ambientes adjacentes e espécies encontradas na região, e as condições climáticas durante e após o derramamento (Santos, 2012). A exposição à estas substâncias pode acarretar em danos biológicos e ecológicos graves como a mortandade dos organismos, e efeitos subletais como dificuldades de locomoção, respiração, reprodução e crescimento, decorrentes da exposição crônica (Yu et al., 2015; Alloy et al., 2016).

Os hidrocarbonetos monoaromáticos benzeno, tolueno, etilbenzeno e os xilenos, conhecidos como BTEX, são compostos orgânicos voláteis encontrados no petróleo e seus derivados, que apresentam baixo ponto de ebulição, solubilidade moderada em água e baixa polaridade (Soloms e Fryhle, 2010). Os BTEX estão entre os compostos mais abundantes na gasolina estando numa fração de 18 - 59% de sua composição (Silva et al., 2009), e além disso, a presença do etanol nesse combustível, torna os BTEX mais solúveis e facilitando sua rápida migração e, por conseguinte contaminação dos ambientes aquáticos (Finotti et al.,

2009). Ademais, esses hidrocarbonetos também são amplamente utilizados na indústria química como matéria-prima na fabricação de plásticos, borrachas, corantes, resinas, defensivos agrícolas e solventes (Merck, 2007).

A presença destas substâncias no meio aquático está associada ao lançamento de efluentes industriais, vazamentos em tanques de armazenamento subterrâneo de postos de gasolina e deposições atmosféricas (Silva et al., 2009; Heleno et al., 2010; Gebara et al., 2013). Em ambientes marinhos, as principais fontes provêm de acidentes durante a extração, produção e transporte de petróleo, porém atividades como lavagens de reservatórios de navios, efluentes oriundos de refinarias e esgotos municipais também podem contribuir para o despejo dessas substâncias no ambiente (Andrade et al., 2010; Menghini et al., 2014).

O descarte da água produzida também é um meio importante de liberação desses compostos. Este líquido é encontrado nas formações subterrâneas e é trazido à superfície juntamente com petróleo e gás durante as atividades de produção desses fluidos. O perigo do descarte deste efluente é devido seu elevado volume e a complexidade da sua composição (Amini et al., 2012). Nesse sentido, é necessário um tratamento específico a fim de atender as demandas ambientais e operacionais (Motta et al., 2013). No Brasil, menos de 50% das instalações de operação apresentam tratamento para descarte da água produzida e muitas plataformas *offshore* enviam esse resíduo para unidades de tratamento em terra (Gabardo, 2007). Em Sergipe, a produção de óleo gera cerca de 40.000m³/dia de água produzida contendo aproximadamente 1000mg.L⁻¹ de óleos e graxas (Gomes, 2009). A Resolução nº 393/2007 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) que regulamenta o descarte da água produzida, estabelece uma concentração limite de 20mg.L⁻¹ de óleos e graxas que podem ser descartados nos corpos receptores (BRASIL, 2007).

Devido aos graves riscos à saúde humana e ao meio ambiente, a legislação ambiental tem se tornado cada vez mais restritivas quanto à presença dos BTEX em águas continentais e marinhas. A resolução CONAMA nº357/05 (BRASIL, 2005), que classifica os corpos de água e estabelece padrões e condições para lançamento de efluentes, determina para água doce valores até 300µg.L⁻¹ de xileno, 90µg.L⁻¹ para o etilbenzeno, 5µg.L⁻¹ de benzeno e 2µg.L⁻¹ de tolueno. Enquanto que para águas salinas são recomendados valores máximos para o benzeno de 700µg.L⁻¹, tolueno 215µg.L⁻¹ e etilbenzeno de 25µg.L⁻¹ (Classe 1), porém não consta para água salina valores dos xilenos. A resolução CONAMA nº 396/08 (BRASIL, 2008) que classifica e enquadra as águas subterrâneas, recomenda valores a nível ambiental de 300µg.L⁻¹ de xilenos, 200µg.L⁻¹ de etilbenzeno, 179µg.L⁻¹ de tolueno e 5µg.L⁻¹ de benzeno. Os mesmos valores são aplicados para consumo de água potável segundo a Portaria nº 2914/2011 do

Ministério da Saúde, que também regulamenta o teor máximo de hidrocarbonetos monoaromáticos que prejudicam as propriedades físicas, químicas e os parâmetros organolépticos (BRASIL, 2011).

O órgão de proteção ambiental internacional Environmental Protection Agency dos Estados Unidos (U.S. EPA) apresentam os mesmos valores de BTEX permissíveis para potabilidade da água que a resolução brasileira. Já a Environment Canada apresentam valores como 0,1 mg.L⁻¹ para o tolueno, 0,06 mg.L⁻¹ de xileno e 0,005mg.L⁻¹ para o benzeno (USEPA, 2003; Environment Canada 1999).

Já na Resolução CONAMA 430/2011 (BRASIL, 2011), que dispõe sobre condições e padrões de lançamento de efluentes, complementando a nº357/2005, os valores permissíveis para o benzeno e tolueno são 1,2mg.L⁻¹, etilbenzeno 0,84mg.L⁻¹ e os xilenos 1,6mg.L⁻¹. Cabe ressaltar que esses valores vão depender da capacidade de suporte do corpo receptor.

Apesar dos esforços no que tange à compreensão dos efeitos danosos dos hidrocarbonetos, boa parte dos estudos focam na toxicidade em mamíferos e são principalmente direcionados para a toxicidade humana, devido a seu potencial carcinogênico e mutagênico (Miri et al., 2016; Vieira, 2004; Peng et al., 2015), e pouco se sabe sobre os efeitos adversos em organismos aquáticos.

Alterações morfológicas, inibição do crescimento celular e clorofila total foram observadas em algas expostas ao BTEX (Herman e Mayfield, 1990; Berton, 2013; Peng et al., 2015). Em um estudo com a exposição da bactéria *Vibrio fischeri* ao benzeno e tolueno constatou-se a diminuição da bioluminescência (Berton, 2013). Dificuldade na capacidade natatória e alterações morfológicas também foram registrados em microcrustáceos (Martinez, 1992; Vieira, 2004; Berton, 2013). Em peixes foram verificados danos nas lamelas branquiais, retardamento na eclosão dos ovos, alterações enzimáticas, diminuição da frequência cardíaca e do fluxo sanguíneo (Mizell e Romig, 1997; Teuschler et al., 2005; Ribeiro, 2007).

Esses compostos são comumente encontrados no ambiente em misturas (Forte et al., 2007). No entanto, a forma de avaliação e monitoramento de substâncias requeridas pela legislação ainda não contemplam os efeitos das misturas de substâncias nos organismos, e geralmente focam em compreender os efeitos das substâncias isoladas (Magalhães e Ferrão Filho, 2008).

Diante disso, estudos foram realizados na tentativa de desenvolver um modelo que descrevesse os efeitos das misturas químicas nas espécies. Dentre eles, os mais bem estabelecidos foram dois modelos conceituais de referência, Concentração de Adição (CA) (Loewe e Muischnek, 1926) e Ação Independente (IA) (Bliss, 1939). Esses modelos são

baseados no conhecimento da toxicidade dos compostos individuais e no modo de ação (MoA) dessas substâncias. De acordo com o modelo CA as substâncias químicas possuem o mesmo modo de ação, ou seja, o mesmo alvo no organismo (Ferreira et al., 2008), já o modelo IA define que as substâncias químicas possuem modos de ação diferentes (Olmstead e Leblanc, 2005). Assim, os efeitos de cada composto serão diferentes e independentes do outro químico (Bliss, 1939).

Normalmente, o modo de ação das substâncias é associado às alterações fisiológicas, citológicas ou mudança na história de vida das espécies em resposta ao estresse causado pelo composto químico (Barata et al., 2007). Quando o modo de ação das substâncias ainda não é conhecido sugere-se que ambos os modelos sejam testados para avaliar qual melhor se encaixa nos dados (Loureiro et al., 2010). Porém, existem misturas que não são totalmente explicadas apenas pelos modelos CA e IA, e nessas situações os efeitos relacionados a esses compostos sofrem desvios dos modelos padrões. Esses desvios podem ser denominados de sinérgicos, quando a mistura causa um efeito mais severo do que as substâncias isoladas, ou antagônicos, quando o efeito da mistura é menos severo. O desvio nível das doses (*dose level dependency*) ocorre quando é observado um sinergismo ou antagonismo em altas ou baixas concentrações dos dois compostos, e por fim, o desvio razão das doses (*dose ratio dependency*) que prediz que a toxicidade irá depender da composição da mistura (Jonker et al., 2005).

Esses modelos e seus desvios já foram testados em estudos sobre a toxicidade de pesticidas, metais e fármacos em cladóceros *Daphnia magna*, larvas de insetos *Sericoxystoma vittatum*, *Chironomus riparius* e no misidáceo *Mysidopsis juniae* (Barata et al., 2006; Ferreira et al., 2008; Pestana et al., 2009; Loureiro et al., 2010; Pavlaki et al., 2011; Figueiredo et al., 2016), como também em testes com misturas binárias associadas a estressores naturais bióticos (Ferreira et al., 2008), e demonstraram ser uma boa ferramenta na previsão do comportamento das misturas em ambientes aquáticos dulcícolas e marinhos.

Os testes de toxicidade aguda com *Mysidopsis juniae* têm sido requeridos pelos órgãos de fiscalização ambiental e são frequentemente realizados no monitoramento de atividades petrolíferas. A norma ABNT NBR 15308 (ABNT, 2011) padroniza a utilização dessa espécie como organismo-teste em bioensaios agudos de ambientes salinos e estuarinos, sendo o único protocolo padronizado para tal teste. O microcrustáceo *Mysidopsis juniae* já foi utilizado na avaliação dos modelos conceituais de misturas (Figueiredo et al., 2016), no efeito dos impactos da carcinicultura (Aragão et al., 2008), na análise de risco dos resíduos de herbicida (Resgalla et al., 2007), nos metais zinco e níquel (Figueiredo et al., 2016), em amostras

ambientais da qualidade de água de estuários (Nicodemo, 2010; Vaz et al., 2013) e na avaliação da toxicidade de tintas anti-incrustantes (Castro et al., 2011).

Tendo em vista os dados apresentados, pode-se observar que os BTX são exemplos de poluentes ambientais, podendo causar efeitos danosos a saúde humana e a biota aquática. Deve-se ressaltar ainda a importância de uma maior compreensão sobre os efeitos de substâncias presentes no petróleo, considerando os impactos causados pela ação dos compostos isolados e em misturas, em regiões como a costa brasileira, onde ocorre intensa atividade petrolífera e incidentes são passíveis de ocorrer.

2. Objetivos

2.1. Geral

Avaliar a toxicidade aguda dos hidrocarbonetos monoaromáticos benzeno, tolueno e xileno, isolados e em misturas binárias no misidáceo marinho *Mysidopsis juniae*.

2.2. Específicos

- ✓ Determinar as concentrações letais (CL₅₀- 96h) do benzeno, tolueno e xilenos isoladamente.
- ✓ Identificar o modo de ação dos hidrocarbonetos em misturas binárias através dos modelos conceituais de Ação Independente (IA) e de Concentração de Adição (CA).

3. Material e métodos

3.1. Reagentes

Para a avaliação da sensibilidade dos misidáceos durante o período deste estudo foram realizados ensaios com o sulfato de zinco heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) adquirido da marca Dinâmica, como substância de referência com concentrações nominais de Zn de 0,075, 0,15, 0,30 e 0,60 mg.L^{-1} . O benzeno, tolueno e xileno foram adquiridos da marca Neon (99,9% pureza), e diluídos sem adição de solvente em água do mar artificial (salinidade 35 ± 2), preparada pela adição de sal marinho (*Red Sea Salt e Instant Ocean*) em água destilada. Foram testadas as seguintes concentrações nominais: 20, 30, 40 e 50 mg.L^{-1} para o tolueno; 5, 10, 15 e 20 mg.L^{-1} de xileno; e 70, 75, 80 e 85 mg.L^{-1} para o benzeno. Todas as exposições foram realizadas em triplicata, e em paralelo ao controle com a água de diluição.

3.2. Manutenção e cultivo dos organismos-teste

A manutenção do cultivo e os ensaios de toxicidade seguiram as recomendações da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) presentes na NBR 15.308/2011 para cultivo dessa espécie (ABNT, 2011). Os espécimes de *M. juniae* (Figura 1) foram mantidos em aquários de vidro com água do mar artificial (6L, 100mL por misidáceo) e salinidade 35 ± 2 . Semanalmente foi feita a renovação parcial da água (aproximadamente 30%), juntamente com a remoção dos juvenis (indivíduos de 1 a 7 dias de vida) para serem utilizados nos testes. A renovação total da água ocorreu uma vez por mês juntamente com pareamento dos organismos (3 ♀ : 1 ♂).

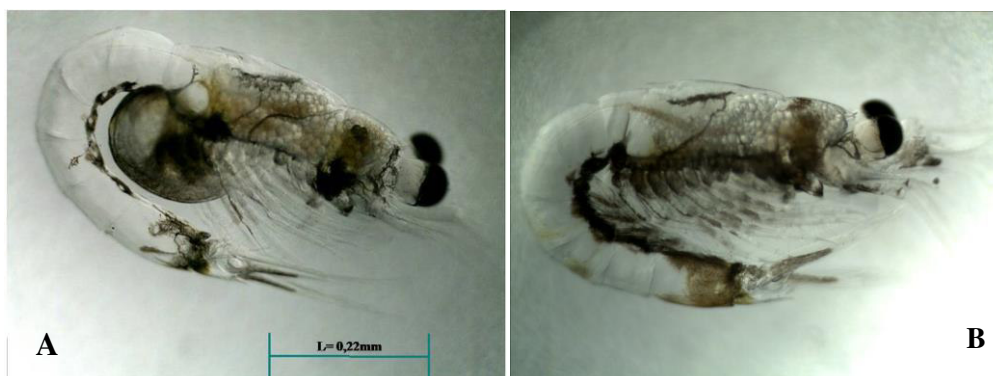


Fig. 1. Misidáceo *Mysidopsis juniae*. A- indivíduo fêmea. B- indivíduo macho.

O cultivo foi mantido em sala climatizada ($24 \pm 2^\circ\text{C}$) com fotoperíodo de 12h luz:12h escuro e aeração constante (Figura 2). Diariamente os animais foram alimentados de acordo

com a idade dos organismos: juvenis até 7 dias de vida foram alimentados *ad libitum* com náuplios de *Artemia* sp. (48h), e os indivíduos adultos as artêmias foram enriquecidas com óleo de fígado de bacalhau e óleo de peixe. A limpeza dos aquários foi feita diariamente com sifonamento do fundo dos aquários.



Fig. 2. Aquários do cultivo dos misidáceos *Mysidopsis juniae*.

Os parâmetros físico-químicos salinidade, pH, oxigênio dissolvido (OD) e temperatura foram verificados no cultivo semanalmente e durante a realização dos testes de toxicidade no início e ao final de cada experimento (ABNT, 2011).

3.3. Ensaios de toxicidade aguda

3.3.1. Substância de referência

Os testes para avaliação da sensibilidade dos organismos seguiram os critérios adotados pela NBR 15308/2011 (ABNT, 2011), e foram realizados mensalmente (outubro de 2015 a dezembro de 2016). A medição dos parâmetros físico-químicos foi realizada no início e fim de cada ensaio, ou quando foi registrada a morte de todos os organismos testados em dada concentração.

Espécimes de *Mysidopsis juniae* de 1 a 7 dias de vida foram expostos às concentrações de zinco (250mL, em triplicata n=30) durante 96h sem renovação das substâncias, nem aeração. A cada 24h foi realizada a contagem dos misidáceos para avaliação da letalidade, e quando possível os organismos mortos foram retirados com auxílio de uma pipeta Pasteur de plástico. Após a contagem, os sobreviventes foram alimentados *ad libitum* com náuplios de *Artemia* sp. (48h) sem óleo. A porcentagem de sobrevivência dos organismos foi avaliada ao final de cada teste e para validação dos mesmos, foi adotada como critério de aceitabilidade

somente os ensaios em que a mortalidade dos organismos no controle foi menor ou igual a 10%. Os testes foram mantidos dentro da incubadora, com temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) e fotoperíodo controlado (12:12), durante todo o tempo do experimento.

3.3.2. Ensaio com substâncias isoladas

Para a realização dos testes agudos com as substâncias isoladas também foi utilizada a NBR 15.308/2011 (ABNT, 2011), seguindo os mesmos critérios adotados para a substância de referência, citados acima. Para cada composto químico foram realizadas quatro repetições.

3.3.3. Ensaio com mistura binária

Os ensaios com as misturas binárias foram feitos seguindo o mesmo procedimento dos ensaios isolados, porém com apenas uma réplica para cada solução teste. A metodologia para mistura binária foi descrita por Jonker et al. (2005), em que as concentrações testadas são resultado de vinte e três combinações binárias de cada dupla de substâncias químicas escolhidas (Figura 3).

A análise dessa metodologia baseia-se num modelo de regressão, em que sustenta a hipótese de que a maior cobertura das concentrações aumenta a confiabilidade dos resultados. Ela é baseada no cálculo de Unidades Tóxicas (UT), na qual 1 UT equivale a $1/CL_{50}$ dos compostos isolados, e o somatório das UT's não deverá ultrapassar 2, evitando assim uma alta mortalidade dos organismos.

3.4. Análise de dados

Nos testes com as substâncias isoladas, após 96h de exposição os ensaios foram encerrados e realizada a contagem final dos indivíduos, seguido do cálculo da CL_{50} , realizado pelo o programa *Trimmed Spearman-Kärber* (Hamilton et al., 1977). Também foi realizada a análise de variância (ANOVA) seguida de Tukey para verificar diferença entre os valores de CL_{50} obtidos durante os testes em três períodos de tempo (24,48 e 96h).

Unidade Tóxica (UT)	
Substância 1	Substância 2
1	1
1	0,75
0,5	1
1	0,5
0,75	1
0,75	0,25
0,5	0,5
0,375	0,625
0,25	0,75
0,125	0,875
0,875	0,125
0,625	0,375
0,75	0,75
0,5	0,25
0,375	0,375
0,25	0,5
0,125	0,625
0,625	0,125
0,375	0,125
0,25	0,25
0,125	0,375
0,25	0,125
0,125	0,25
0	0

Fig. 3. Combinações binárias em unidades tóxicas que serão utilizadas para avaliação do efeito da mistura.

Em relação aos ensaios com as misturas, os dados foram analisados pelo modelo MIXTOX, que avalia os modelos de referência Adição de Concentração e Ação Independente. Foi observado também se os dados obtidos sofreram desvios significativos na resposta desses modelos, podendo produzir um padrão, seja ele de antagonismo, sinergismo, respostas dose-dependentes ou uma resposta dependente da razão de doses, como proposto por Jonker et al., (2005). Esses desvios foram obtidos segundo as observações de dois parâmetros, *a* e *b*, os valores encontrados nesses parâmetros são referentes às inclinações da reta (Tabela 1). Após esta etapa, os dados foram ajustados para ambos os modelos conceituais e seus desvios, e o melhor ajuste foi escolhido pela comparação da máxima verossimilhança. A interpretação biológica destes desvios é descrito na Tabela 1. Os gráficos referentes às misturas foram realizados utilizando o programa SigmaPlot.

Tabela 1. Interpretação dos parâmetros adicionais (a e b) que definem a função de desvio dos modelos conceituais de Concentração de Adição (CA) e Ação Independente (IA), adaptado de Jonker et al. (2005).

Desvio do padrão	Parâmetro a (CA e IA)	Parâmetro b (CA)	Parâmetro b (IA)
Sinergismo/ antagonismo (S/A)	a>0: antagonismo a<0: sinergismo		
Razão de doses (DR)	a>0: antagonismo exceto para as misturas no qual valores de b negativo indica sinergismo. a<0: sinergismo exceto para as misturas no qual valores de b positivo indica antagonismo.	bi>0: antagonismo, onde a toxicidade da mistura é causada principalmente pelo químico i. bi<0: sinergismo, onde a toxicidade da mistura é causada principalmente pelo químico i.	
Dose-dependência (DL)	a>0: antagonismo em doses baixa e sinergismo em doses mais altas. a>0: sinergismo em doses baixa e antagonismo em doses mais altas.	bDL>1: desvios em concentrações inferiores a CL ₅₀ . bDL=1: desvios em concentrações semelhantes a CL ₅₀ 0<bDL< 1: desvios em concentrações superiores a CL ₅₀ . bDL< 1: não há desvio dessa natureza, mas a magnitude do S/A dependente da dose.	bDL>2: desvios em concentrações inferiores a CL ₅₀ . bDL=2: desvios em concentrações semelhantes a CL ₅₀ 1<bDL<2: desvios em concentrações superiores a CL ₅₀ . bDL<1: não há desvio dessa natureza, mas a magnitude do S/A dependente da dose.

3.5. Análise Química

A análise química dos hidrocarbonetos dissolvido nas amostras foi realizada por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas – CG-MS para mensurar a concentração das soluções de BTX testadas. O modelo do cromatógrafo utilizado foi GCMS-QP2010 Plus da marca Shimadzu com injetor AOC20i, coluna capilar DB- 5MS (5% difenil 95% dimetilpolisiloxano; 30m, 0,25mm ID, 0,25 μ m) com gás de arraste hélio (99,999%) com vazão de 1,2mL min⁻¹. O espectrômetro de massas foi operado no modo SIM (monitoramento de íons selecionados) com ionização por elétrons (EI) a 70eV, a injeção foi via *headspace* manual.

A metodologia utilizada para as análises foi adaptada de Heleno et al (2010) que seguiu a técnica de *headspace* estático, no qual 25mL das soluções isoladas testadas foram acondicionados em *vials* de vidro de 50mL contendo 200 μ L do padrão interno hexametil benzeno (20mg.L⁻¹). Após adição da amostra e fechamento, o *vial* foi agitado e mantido em um bloco de alumínio aquecido em manta aquecedora a 75°C por 30min para ocorrer o *headspace*. Em seguida foi aspirado 500 μ L do vapor e injetado no cromatógrafo. O limite de detecção do método foi de 0,1mg.L⁻¹.

4. Resultados e discussão

4.1. Substância de Referência

Os testes para avaliação da sensibilidade do *M. juniae* com o sulfato de zinco obteve uma CL₅₀(96h) de 0,36 \pm 0,05mg.L⁻¹, os parâmetros físico-químicos apresentaram valores de pH mínimo 7,7 e máximo 8,5 com coeficiente de variação (CV) de 1,8%, o OD variou de 4 a 5,7mg.L⁻¹ (CV-8,1%), salinidade 33 a 35 (CV-1,8%) e temperatura de 24,8 a 27,3°C (CV-11,2%). A carta-controle do laboratório foi montada para melhor visualização dos resultados ao longo do tempo, onde os limites estão compreendidos entre a média das CL₅₀, acrescida ou diminuída duas vezes o seu desvio padrão ($\bar{x} \pm 2DP$), símbolos diferentes foram usados para elucidar o período em que ocorreram os testes com os BTX (Figura 4).

Os valores das CL₅₀ encontradas mantiveram-se dentro da faixa aceitável, sendo assim o misidáceo mostrou-se sensível à substância de referência, viabilizando o estudo. Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores, ao verificaram a sensibilidade da espécie para o mesmo composto químico encontraram valores entre 0,25 a 0,46 mg.L⁻¹ (Nicodemo, 2010; Figueiredo et al., 2016).

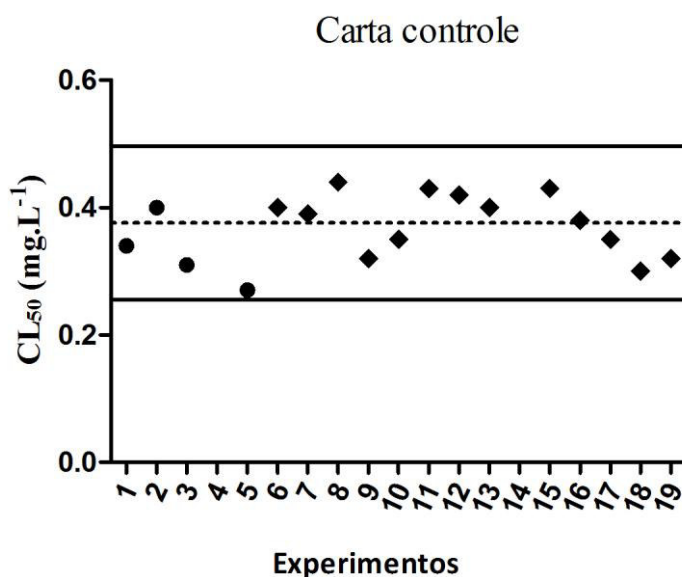


Fig. 4. Carta controle para o misidáceo *Mysidopsis juniae* durante os meses de agosto de 2014 a dezembro de 2016 utilizando o sulfato de zinco. O símbolo representado pelas bolas refere-se aos experimentos realizados antes do início dos testes com os BTX.

4.2. Análise Química

Nos resultados das análises cromatográficas pôde-se observar que as concentrações do tolueno e benzeno foram menores do que as previstas a partir dos cálculos nominais. No entanto, as concentrações do xileno ficaram próximas do esperado (Tabela 2). Este fato pode está ligado à solubilidade dessas substâncias, já que os BTX são considerados moderadamente solúveis em água e apresentam valores de solubilidade para o benzeno de 1.757mg.L⁻¹, tolueno 567mg.L⁻¹ e xileno de 202 mg.L⁻¹ (FISPQ, 2015; FISPQ, 2016).

É importante ressaltar que todos os experimentos foram realizados em água salina e sem adição de solvente, e a solubilidade desses compostos na água do mar é menor do que em água doce devido ao efeito *salting out* que prediz que a maior quantidade de sais inorgânicos na solução acarreta num aumento da força iônica exercida no meio, reduzindo a solubilidade do analito (Jardim, 2010). Como tentativa de prever a magnitude deste efeito no tolueno, foi realizado experimentos com doze diferentes tipos de sais inorgânicos a 25°C, e percebeu-se que a adição dos sais diminuiu acentuadamente os valores da solubilidade em todas as amostras, algumas tendo diminuição maior que 50% a depender do sal e a pressão iônica exercida por ele (Sada et al., 1975). A solubilidade de um composto é um fator importante ao estudar uma substância potencialmente tóxica para o ambiente aquático, pois o aumento da solubilidade acarreta numa maior amplitude de distribuição e transporte, podendo causar maiores danos ao meio (Corseuil e Fernandes, 1999).

Foi observado nos ensaios com *M. juniae* a diminuição da concentração dos compostos por volatilização nas primeiras 24h com redução entre 28,9 e 89,7%. Em 96h de exposição, os valores para todas as concentrações testadas do tolueno e xileno foram menores que 0,1mg/L (limite de quantificação), e o benzeno apesar da perda por volatilização durante o experimento apresentou concentrações finais mensuráveis (entre 1,95 a 2,05 m.L⁻¹). Os hidrocarbonetos monoaromáticos BTX são amplamente conhecidos devido sua volatilidade, entre os fatores responsáveis por essa característica está à pressão de vapor das substâncias. De acordo com a U.S. EPA (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos), compostos voláteis são aqueles que possuem valores $\geq 1,32 \times 10^{-10}$. Os valores das pressões de vapor à 20°C (atm) para benzeno, tolueno e xilenos são 0,1250, 0,0370 e 0,00895KPa, respectivamente (Takeuchi et al., 2012).

Tabela 2.

Valores das concentrações reais para o tolueno, xileno e benzeno em três tempos de exposição (0, 24 e 96h) e concentração nominal.

Substância	Concentração (mg.L ⁻¹)			
	Nominal	Real		
		0h	24h	96h
Tolueno	0	0	0	0
	20	10,4	8,6	0
	30	13,1	8,8	0
	40	30,1	11,7	0
	50	33,0	14,9	0
Xileno	0	0	0	0
	5	10,4	8,6	0
	10	10,7	8,7	0
	15	15,5	9,0	0
	20	20,5	9,3	0
Benzeno	0	1,9	2,0	0
	70	30,7	9,9	1,9
	75	34,4	14,2	1,9
	80	55,0	13,6	2,0
	85	60,5	6,3	2,0

4.3. Ensaios com compostos isolados

Nos testes com BTX isolados, os parâmetros físico-químicos mantiveram-se dentro dos valores estabelecido pela NBR 15308/2011, estando à temperatura com valor mínimo de 23,8 e máximo de 26,6°C (CV-6,3%), pH variando entre 7,1 e 8,3 (CV-3,35%) e OD entre 4,0

e 6,1mg.L⁻¹(CV-14,1%), a única exceção foi a salinidade que variou de 34 a 38 (CV-2,16%) ficando acima do recomendado, porém não foi observada alteração na sobrevivência dos misidáceos devido à isto.

O tolueno, xileno e o benzeno foram tóxicos para o *M. juniae*, sendo que a sobrevivência diminuiu consideravelmente nas primeiras 24h, permanecendo praticamente a mesma com aumento do tempo de exposição. A CL₅₀ em 96h para o tolueno foi 38,0±5,3mg.L⁻¹, também foram calculadas as CL₅₀ nos períodos de tempo 24 e 48h, mas não houve diferença significativa entre eles (Tabela 2). A pequena variação das CL₅₀ ao longo do tempo se explica pelo fato das concentrações se reduzirem, e ficarem próximas de 0mg/L após 96h. Não foi possível calcular as CL₅₀ nos experimentos com o benzeno em 24 e 48h e no xileno em 24h, pois nesses períodos ainda não haviam ocorrido à mortalidade de 50% dos indivíduos.

Tabela 3.

Concentração letal (CL₅₀) dos BTX para o *Mysidopsis juniae* nos períodos de 24, 48 e 96h mais desvios-padrões.

Substância	Tempo de exposição(h)	CL ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Desvio-padrão
Tolueno	24	39,3	4,6
	48	38,6	4,7
	96	38,0	5,3
Xileno	24	-	-
	48	16,5	2,4
	96	16,2	2,5
Benzeno	24	-	-
	48	-	-
	96	78,7	2,9

As concentrações dos BTX nesse estudo foram diminuindo ao longo do experimento, assim como foi visto para a bactéria *Vibrio fischeri* exposta ao benzeno e tolueno, onde houve volatilização de aproximadamente 21% no tolueno e 42% no benzeno em experimentos de 30min (Berton, 2013). Em bioensaios com a alga *Euglena gracilis* também houve perdas de BTEX por volatilização de 4-14% no primeiro dia e 78-88% no quinto dia, os xilenos foram os mais voláteis seguidos do etilbenzeno, tolueno e o benzeno (Peng et al., 2015). Esses autores relataram dificuldades na realização dos testes devido à natureza volátil dessas substâncias, como a falta de reprodutibilidade nos ensaios com a bactéria e diminuição do tempo de exposição para 24h nos testes com a alga.

Em relação aos xilenos, a média da $CL_{50}(96h)$ foi de $16,1 \pm 2,3 \text{ mg.L}^{-1}$, sendo o composto químico mais tóxico para o microcrustáceo *M. juniae*. Resultados semelhantes foram vistos em outros estudos envolvendo organismos aquáticos como a alga *Pseudokirchnerella subcapitata*, onde o benzeno foi o menos tóxico para o grupo (41 mg.L^{-1}), seguido pelo tolueno ($9,4 \text{ mg.L}^{-1}$), etilbenzeno ($4,8 \text{ mg.L}^{-1}$), p-xileno ($4,4 \text{ mg/L}$), m-xileno ($3,9 \text{ mg/L}$) e orto-xileno ($4,2 \text{ mg/L}$), logo a toxicidade aumentou de acordo com o grau de substituição do grupo metila no anel aromático (Herman e Mayfield, 1990).

Xuefeng, et. al. (2013) investigaram a toxicidade aguda do TEX (tolueno, etilbenzeno e xileno) nas larvas do inseto *Chironomus plumosus* em bioensaio semi-estático (48h) e observaram que o etilbenzeno ($CL_{50} 37,8 \text{ mg/L}$) apresentou maior toxicidade seguido do xileno ($CL_{50} 42 \text{ mg/L}$) e tolueno ($CL_{50} 64,9 \text{ mg/L}$). Outros efeitos adversos como alterações morfológicas, diminuição do teor de clorofila e formação do pigmento intracelular lipofuscina foram visualizados na alga unicelular *Euglena gracilis* expostas a $8,8$ a 40 mg.L^{-1} de xilenos (Peng et al., 2015).

O benzeno foi o composto menos tóxico para o *M. juniae*, com uma $CL_{50} (96h)$ de $78,7 \pm 2,9 \text{ mg.L}^{-1}$. Nas exposições com benzeno foi observado um comportamento dos misidáceos distinto das demais exposições, pois durante as primeiras 5h foi observado que os espécimes de todas as concentrações testadas ficaram imóveis no fundo do béquer com espasmos esporádicos, recuperando a capacidade de natação após 24h do início do teste nas concentrações inferiores a 85 mg.L^{-1} . Tal observação também foi relatada por Martinez (1992) que percebeu a diminuição significativa da capacidade natatória do *M. juniae* (80-90%) expostos a concentrações de benzeno 20 mg/L durante 6h. Estes resultados indicam que a exposição a concentrações subletais de benzeno pode afetar temporariamente o desenvolvimento dos indivíduos, comprometendo atividades de alimentação, reprodução e fuga.

O comprometimento da capacidade natatória pode está relacionada com alterações enzimáticas, como a diminuição da atividade da acetilcolinesterase (AChE), que é responsável pela clivagem do neurotransmissor acetilcolina após sua liberação nas fendas sinápticas. A inibição desta enzima acarreta no bloqueio da transmissão de impulsos nervosos, paralisando as funções vitais devido a sobreposição desses impulsos (Xuerebet al., 2009). Esse efeito ocorreu com a tilápia *Sarotherodon mossambicus* exposta ao tolueno em concentrações de 25 e 50 mg.L^{-1} durante 10 semanas, onde foi observado a inibição da AChE e da succinato desidrogenase (enzima envolvida no ciclo de Krebs) presentes no rim, fígado, cérebro,

intestino e nos músculos esqueléticos, resultando na perturbação do sistema nervoso e distúrbios nos processos celulares oxidativos (Dange e Masurekar, 1981).

A exposição do benzeno no peixe marinho *Mugil curema* desencadeou modificações nas trocas gasosas, com o aumento na taxa de respiração, além de inchaços no epitélio branquial e acúmulo de muco sobre os filamentos e rastros branquiais nos organismos expostos a 10mg.L^{-1} de benzeno. Os danos nas brânquias diminuem a energia disponível, devido à anóxia gerada pela redução da tomada de oxigênio nesse tecido, e resultam em imobilidade e exaustão (Correa e Garcia, 1990). Além disso, foi observado na alga *Pseudokirchnerella subcapitata* aumento da densidade e contração do citoplasma para longe das paredes celulares (Haman e Mayfield, 1990). Também foi visto em *Daphnia magna* pequenos inchaços internos na carapaça e flutuação dos organismos sobre a superfície da coluna de água decorrentes da exposição ao benzeno. As alterações nas densidades observadas foram atribuídas à baixa densidade do benzeno e sua absorção pelas membranas celulares (Berton, 2013).

Dentre os BTX, o benzeno é considerado o mais tóxico para a saúde humana devido seu potencial carcinogênico e mutagênico (Mohammadyan et al., 2016). Contudo, os resultados da maioria dos ensaios ecotoxicológicos com organismos aquáticos revelam que a toxicidade do benzeno é inferior ao do tolueno e xilenos, inclusive no presente estudo (Di Marzio e Saenza, 2004; Teuschler et al., 2005; Penget al., 2015).

Ao comparar a toxicidade desses compostos em diferentes microcrustáceos pode-se perceber uma variação nos valores e respostas, e estas podem ser associadas a sensibilidade de cada espécie estudada e a diferença de metodologia utilizada em cada ensaio. Para *Daphnia magna* em sistema estático e sem renovação da substância foi observado valores de $\text{CE}_{50}(48\text{h})$ para benzeno de $73,23 \pm 8,25\mu\text{g.L}^{-1}$ e tolueno $81,58 \pm 7,62\mu\text{g.L}^{-1}$ (Berton, 2013), já no estudo avaliando a toxicidade em *D. magna* e *Ceriodaphnia dubia* em sistema estático fechado com renovação das soluções-teste mostrou uma tendência similar entre a sensibilidade das espécies, sendo que a $\text{CL}_{50}(24\text{h})$ encontrada para *C. dubia* foi $18,4 \pm 3,2\text{mg.L}^{-1}$ no benzeno e $9,0 \pm 3\text{mg.L}^{-1}$ para o tolueno e para *D. magna* valores de $\text{CL}_{50}(48\text{h})$ para o benzeno $17,5 \pm 2,3$ e tolueno $6,37 \pm 1,2\text{mg.L}^{-1}$ (Tosato et al., 1993). Os estudos acima citados foram realizados com espécies de água doce.

Para o misidáceo marinho *Metamysidopsis elongata atlântica* exposto ao benzeno e tolueno em sistema estático foram encontrados valores de $\text{CL}_{50}(48\text{h})$ para o tolueno de $235 \pm 5,4\mu\text{g.L}^{-1}$ e o benzeno de $95 \pm 4,5\mu\text{g.L}^{-1}$, evidenciando maior toxicidade do benzeno em relação ao tolueno (Vieira, 2004). Este trabalho obteve respostas distintas das encontrados no presente

estudo, onde o benzeno foi o composto menos tóxico e o *M. juniae* apresentou menor sensibilidade aos hidrocarbonetos. Contudo, mesmo sendo animais marinhos e pertencentes à mesma família pode-se encontrar resultados distintos, pois a sensibilidade dos organismos pode variar de acordo com a espécie estudada. Dados destes e outros trabalhos estão listados na tabela 4, mas é relevante observar que a maioria dos dados exemplificados é de animais de água doce e a comparação com os organismos marinhos deve ser feita de maneira cautelosa.

Tabela 4.

Valores de efeitos para os BTX em diferentes grupos de animais, calculadas em tempos de exposição distintos.

	Espécie	Ambiente	Benzeno CL ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Tolueno CL ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Xileno CL ₅₀ (mg.L ⁻¹)	Solvente	Fonte
Alga	<i>S. capricornutum</i>	Água doce	41	9,4	Entre 3,9 e 4,4	Bristol	Herman e Mayfield, 1990
Alga	<i>D. subspicatus</i>	Água doce	0,1979	0,00727	-	Metanol	Berton, 2003
Alga	<i>Euglena gracilis</i>	Água doce	89,59	44,13	meta:40,6 orto:24,7 para:8,8	DMSO	Peng et al., 2015
Inseto	<i>Chironomus plumosus</i>	Água doce	-	42	37,8	DMSO	Xuefeng, et. al. 2013
Crustáceo	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Água doce	18,4±3	9,0±3	-	-	Marchine et al., 1993
Crustáceo	<i>Daphnia magna</i>	Água doce	17,5 ±2,4	6,37 ± 1,21	-	-	Tosato et al., 1993
Crustáceo	<i>Daphnia magna</i>	Água doce	0,073	0,081	-	Metanol	Berton, 2003
Crustáceo	<i>M. e. atlantica</i>	Marinho	0,095	0,235	-	-	Vieira, 2004
Crustáceo	<i>M. juniae</i>	Marinho	78,7±2,9			Não foi utilizado	Presente estudo
Larva de peixe	<i>Pimephales promelas</i>	Água doce	15,6±1,6	17±1,9	-	-	Marchine et al., 1993
Embrião de peixe	<i>Embrião de Medaka</i>	Água doce	177±25	21±4,5	-	Não foi utilizado	Teuschler et al., 2005
Peixe	<i>B. iheringii</i>	Água doce	16 ±2,5	15,6±2,3	orto: 9,9 ±4,5 meta: 11,2±4,4 para: 6,9± 3,0	Não foi utilizado	Di Marzio e Saenza,2004

Os estudos sobre os efeitos dos BTEX se intensificaram nas últimas décadas e a maioria dos trabalhos estão direcionados a mamíferos, sobretudo na toxicidade humana. Isto se deve ao potencial nocivo dessas substâncias mediante as frequentes exposições ambientais e ocupacionais que as pessoas estão propensas. E dentre os estudos sobre os efeitos em organismos aquáticos (Peng, et al., 2015), grande parte dos trabalhos tem enfoque no ambiente dulcícola, existindo uma lacuna em estudos voltados para o meio marinho. E isto gera uma problemática, uma vez que esse meio também está propenso a contaminações de BTEX por diferentes atividades, seja ela industrial ou devido às intensas atividades petrolíferas que ocorrem nesse ambiente. Assim, estudos envolvendo essa temática são importantes como meio de previsão de potenciais efeitos adversos que esse ambiente está exposto.

4.5. Ensaios com misturas binárias

Os parâmetros físico-químicos obtidos nestes ensaios foram: pH mínimo de 7,8 e máximo 8,22 (CV 0,95%), OD mínimo 4 e máximo 6,7mg.L⁻¹ (CV 18,3%), salinidade mínima de 33 e máxima 37 (CV 3,3%) e temperatura mínima de 23,1 e máxima 28,5°C (CV 3,7%). Todas as misturas binárias foram testadas nos modelos conceituais de Concentração de adição e Ação Independente e a partir dos resultados foi possível entender qual melhor modelo e seus desvios, prediz os efeitos.

Segundo os resultados da letalidade encontrada nas misturas foi possível observar que o modelo CA foi melhor ajustado para todos os dados analisados. Ao incluir os parâmetros a , b_i e BDL foi verificado um melhor ajuste para os seguintes desvios ($p < 0,05$): antagonismo para a mistura xileno e benzeno e dependência em relação às razões entre as doses para xileno e tolueno; tolueno e benzeno (Apêndice 1).

Os efeitos observados na mistura binária do xileno com o tolueno foram melhor explicados pelo desvio razão das doses (73,5%) apresentando um resíduo (SS) de 39,47 e $p < 0,05$. Os valores de $a > 0$ e $b_i < 0$ sugeriram que a toxicidade dessa mistura foi ocasionada principalmente pelo xileno, isto é, quando ocorre altas concentrações de xileno e baixas concentrações de tolueno é observado o sinergismo, e em baixas concentrações de xileno e altas de tolueno, o antagonismo (Figura 5).

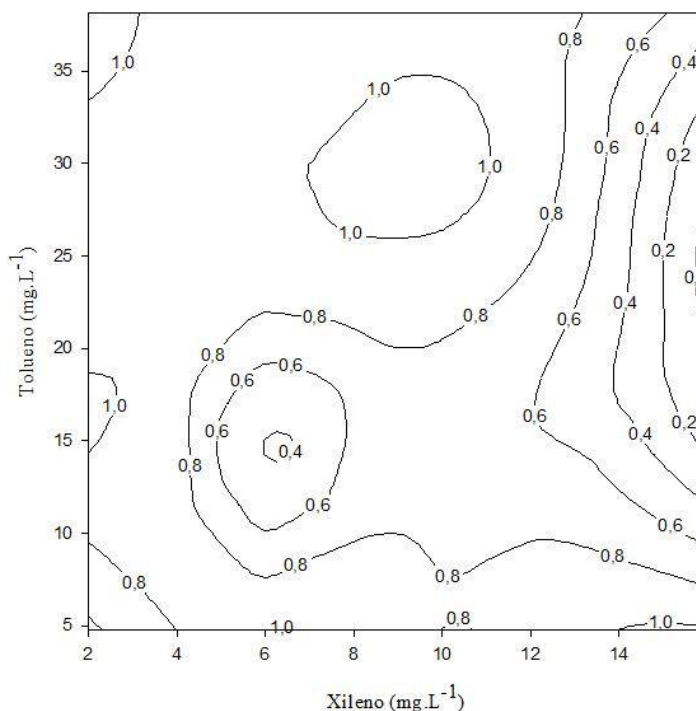


Fig. 5. Efeito da sobrevivência de *Mysidopsis juniae* expostos a mistura binária de xileno e tolueno.

Ao analisar a mistura de tolueno e benzeno também foi observado que o desvio que melhor se enquadrou aos dados foi razão das doses. Esse desvio explicou 83,7% dos dados com $SS=38,53$ e $p<0,05$. Nesse caso, o benzeno foi responsável pela toxicidade da mistura ocorrendo o sinergismo em altas concentrações desta substância juntamente com baixas concentrações do tolueno, e antagonismo em baixas concentrações do benzeno e altas do tolueno (Figura 6).

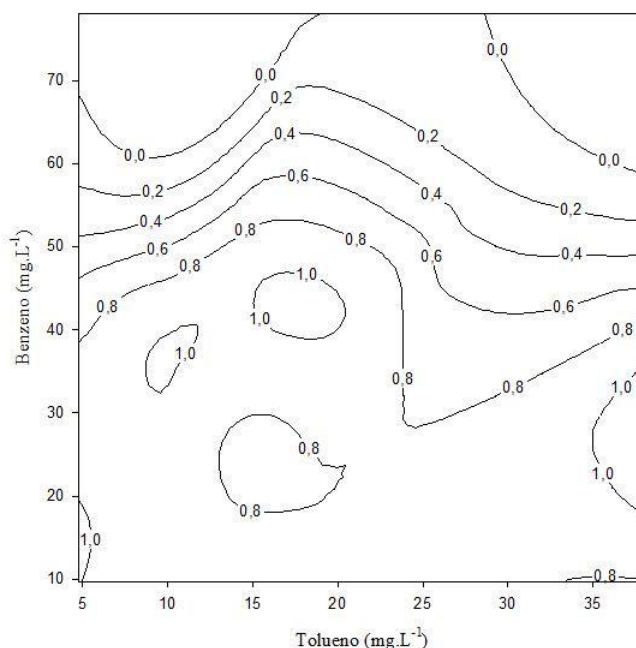


Fig. 6. Efeito da sobrevivência do *Mysidopsis juniae* expostos a mistura binária de tolueno e benzeno.

Como foi citado anteriormente, para a mistura do xileno com o benzeno o antagonismo foi o desvio que melhor se enquadrou aos resultados, ele explicou 42,86% dos dados e obteve como valor do resíduo 39,74 e $p<0,05$ (Figura 7).

Diante do que foi exposto, pode-se sugerir que esses hidrocarbonetos possuem o mesmo modo de ação. Esse resultado já era esperado devido à semelhança de suas estruturas químicas e propriedades físico-químicas, assim como as semelhanças dos efeitos nos organismos. No entanto, misturas podem apresentar diferentes tipos de ação conjunta em função da suas diferentes proporções e concentrações (Xuefeng et al., 2013). Por isso, compreender os efeitos toxicocinéticos e toxicodinâmicos nos organismos contribui positivamente no entendimento do modo de ação das substâncias envolvidas, por exemplo, alterações nas atividades enzimáticas (Ferreira et al., 2008).

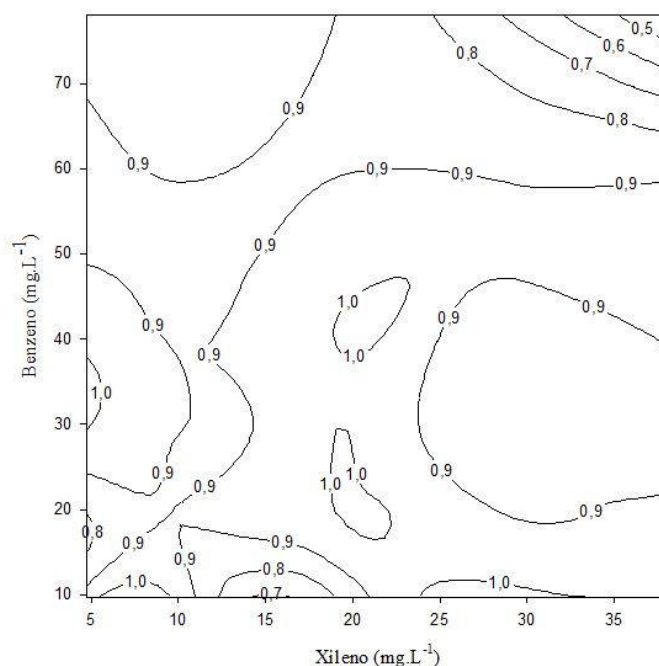


Fig. 7. Efeito da sobrevivência de *Mysidopsis juniae* expostos a mistura binária de xileno e benzeno.

Os BTX são conhecidos pela tendência de se aderir e acumular na porção lipídica dos organismos, ocasionando lesões nas membranas plasmáticas, nuclear e em brânquias. Mudanças morfológicas no núcleo das células e na densidade dos organismos também foram vistos (Berton, 2013; Peng et al., 2015), assim como danos em celulares e alterações enzimáticas (Dange e Masurekar, 1981; Mizell e Romig, 1997; Teuschler et al., 2005; Ribeiro, 2007). Mas até o momento não foram vistos relatos na literatura sobre os efeitos de misturas dos BTX em misidáceos, existem dados de outras espécies tais como a alga *E. gracilis*, embriões dos peixes *Oryzias latipes* *Danio rerio* e a larva do inseto *C. plumosus* (Mizell e Romig, 1997; Teuschler et al., 2005; Xuefeng et al., 2013; Peng et al., 2015). No entanto, todos esses estudos são voltados para o meio dulcícola, não sendo encontrado estudo com crustáceos ou animais marinhos, salientando mais uma vez a necessidade de trabalhos que possam prever os efeitos dos BTX em organismos desse ambiente.

As respostas da exposição de *E. gracilis* em soluções de BTEX isolados e em mistura adotaram o modelo adição de concentração (CA) ao avaliar efeitos sobre a clorofila total e inibição do crescimento em todos os tratamentos testados (Peng et al., 2015). Teuschler et al., (2005) avaliaram a frequência cardíaca no desenvolvimento do embrião de peixes medaka

(*Oryzias latipes*) expostos a três misturas binárias de benzeno e tolueno utilizando um modelo estatístico de detecção de desvios de aditividade para prever respostas sinérgicas ou antagônicas. Contudo, esse modelo foi pouco conclusivo para a mistura de benzeno (177mg.L⁻¹) com tolueno (14 mg.L⁻¹), e nos tratamentos benzeno (142mg.L⁻¹) e tolueno (14 e 21mg.L⁻¹) foi observado efeito sinérgico em 72h de exposição com diminuição da frequência cardíaca seguido de antagonismo em 96h.

De forma semelhante, a combinação de tolueno e benzeno agiu sinergicamente em embriões do peixe *Danio rerio* que desenvolveram anormalidades cardiovasculares. A mistura dos compostos foi mais tóxica (CL₅₀ 96h 0,005 mg.L⁻¹) para os embriões do que as substâncias isoladas (tolueno CL₅₀ 0,1mg.L⁻¹ e benzeno CL₅₀ 0,05mg.L⁻¹) (Mizell e Romig, 1997). Os resultados da letalidade nas larvas de *C. plumosus* expostas às misturas binárias de tolueno e etilbenzeno, xileno e etilbenzeno e tolueno e xileno apresentaram efeitos aditivo, sinérgico e aditivo, respectivamente (Xuefeng et al., 2013).

Na última década trabalhos com misturas foram desenvolvidos utilizando os modelos de referência CA e IA e seus respectivos desvios (sinergismo, antagonismo, razão das doses e nível das doses) com metais, inseticidas e fungicidas ou combinações associadas a estressores naturais bióticos (Pestana et al., 2009; Pavlaki et al., 2010; Pavlaki et al., 2011; Figueiredo et al., 2015), sendo este o primeiro estudo de mistura de hidrocarbonetos monoaromáticos BTX utilizando o MIXTOX.

De acordo com o resultado obtido nesta pesquisa, todos os experimentos se enquadraram melhor nos desvios do modelo de referência CA. Os efeitos dependentes da razão das doses foram vistos em duas das três misturas realizadas, esse desvio ocorre em casos onde a toxicidade vai depender da composição da mistura, onde a toxicidade é causada principalmente por um dos compostos (Jonker et al., 2005). O desvio para o antagonismo ocorre quando todas as combinações de uma mistura causam um efeito menos grave que os compostos isolados (Loureiro et al., 2010). O desvio razão das doses também foi visto em mistura do fungicida carbendazim com o metal cádmio ao avaliar a sobrevivência (48h) de *Daphnia magna*, a toxicidade se manteve alta quando as concentrações de cádmio foram preponderantes, enquanto que concentrações elevadas do carbendazim pouco interferiram na sobrevivência dos organismos. Já nas exposições crônicas (24h) foi observado um padrão para o antagonismo no modelo IA para esta mistura (Ferreira et al., 2008).

É interessante perceber que diferentes padrões de resposta podem ser observados a depender da resposta biológica avaliada, por exemplo, em estudo com *D. magna* em exposição aos inseticidas imidacloprida e tiacloprideo sinergismo foi observado em

exposições agudas, enquanto que o antagonismo foi melhor aplicado sobre o teste de inibição alimentar. Ao testar a mistura níquel e clorpirifós, o sinergismo também foi observado durante a exposição aguda e um desvio da razão de dose sobre a taxa de inibição alimentar (Loureiro et al., 2010).

Avaliar o efeito das misturas das substâncias químicas nos organismos é bastante complexo, todavia os modelos de referência já provaram ser uma boa ferramenta na avaliação de respostas a misturas binárias (Jonker et al., 2005; Loureiro et al., 2010, Pavlaki et al., 2010), inclusive para os BTX. Contudo alguns autores fazem ressalvas quanto ao método, como melhor calibração dos modelos para avaliação de respostas a mais concentrações de cada estressor e suas combinações, e embora seja uma importante ferramenta na avaliação de efeitos, os modelos não devem ser considerados absolutos e conclusivos (Pestana, et al., 2009; Pavlaki et al., 2010).

5. Conclusão

Os hidrocarbonetos monoaromáticos BTX foram tóxicos para o misidáceo *M. juniae*, sendo o xileno mais tóxico seguido pelo tolueno e benzeno. Quanto à interpretação dos efeitos as misturas binárias desses compostos em meio aos modelos conceituais CA e IA e seus desvios foi observado um padrão de antagonismo para o xileno e benzeno e razão das doses para as misturas de xileno e tolueno e tolueno e benzeno.

Testes de toxicidade com ênfase nos efeitos do petróleo e seus componentes em ambiente marinho são de extrema importância devido à vulnerabilidade dos ecossistemas marinhos e costeiros e as constantes ameaças que eles vêm sofrendo proveniente desta atividade. A escolha do misidáceo marinho nativo *M. juniae* como organismo-teste para o estudo foi relevante considerando a intensa atividade de extração de petróleo em plataformas existente no Brasil.

Referências bibliográficas

- ABNT Associação Brasileira de Norma Técnicas. 2011. NBR15308: Ecotoxicologia aquática -Toxicidade aguda - Método de ensaio com misidáceos (Crustacea) p19.
- Agência nacional do petróleo, gás natural e biocombustíveis (ANP). 2012. Boletim da Produção de Petróleo e Gás Natural. Disponível em: http://www.anp.gov.br/wwwanp/images/publicacoes/boletinsanp/Boletim_de_janeiro-2017.pdf . Accessed: 15 March 2017.
- Alloy, M., Baxter, D., Stieglitz, J., Mager, E., Hoenig, R., Benetti, D., Roberts, A., 2016. Ultraviolet radiation enhances the toxicity of Deepwater Horizon oil to mahi-mahi (*Coryphaenahippurus*) embryos. *Environmental science&technology*, 50,2011-2017.
- Amini, S., Mowla, D., Golkar, M., Esmailzadeh, F. 2012. Mathematical modelling of a hydrocyclone for the down-hole oil-water separation (DOWS). *Chemical Engineering Research and Design*, 90, 2186-2195.
- Andrade, J. de A., Augusto, F., Jardim, I.C.S.F., 2010. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. *Eclética Química* 35, 17–43. doi:10.1590/s0100-46702010000300002
- Aragão, J.S., Castro, C.B., Costa-Lotufo, L.V., 2008. Toxicidade do metabissulfito de sódio em *Mysidopsis juniae*. *Arquivos de Ciências do Mar* 41, 24–29.
- Badaró-Pedroso, C., Reynier, M.V., Prósperi, V.A., 2002. Testes de toxicidade aguda em misidáceos - ênfase nas espécies *Mysidopsis juniae* e *Mysidium gracile*(Crustacea: Mysidacea), in: Nascimento, I.A., Sousa, E.C.P.M.,Nipper, M., (Eds), Métodos de ecotoxicologia marinha. Aplicações no Brasil.Artes Gráficas e Indústria Ltda, 123-139.
- Barata, C., Baird, D.J., Nogueira, A.J.A., Agra, A.R., Soares, A.M.V.M., 2007. Life-history responses of *Daphnia magna* Straus to binary mixtures of toxic substances: Pharmacological versus ecotoxicological modes of action. *Aquatic Toxicology* 84, 439–449. doi:10.1016/j.aquatox.2007.07.004
- Barata, C., Baird, D.J., Nogueira, A.J.A., Soares, A.M.V.M., Riva, M.C., 2006. Toxicity of binary mixtures of metals and pyrethroid insecticides to *Daphnia magna* Straus. Implications for multi-substance risks assessment. *Aquatic Toxicology* 78, 1–14. doi:10.1016/j.aquatox.2006.01.013
- Barron, M.G., Podrabsky, T., Ogle, S., Ricker, R.W., 1999. Are aromatic hydrocarbons the primary determinant of petroleum toxicity to aquatic organisms? *Aquatic Toxicology* 46, 253–268.
- Berton, S.M.H., 2013. Estudo da toxicidade de hidrocarbonetos monoaromaticos utilizando *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* e *Desmodesmus subspicatus*. Dissertação de mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR 156p.
- Bird, M.G., Greim, H., Snyder, R., Rice, J.M., 2005. International symposium: recent advances in benzene toxicity. *Chemico-biological interactions* 5, 153–154. doi:10.1016/j.cbi.2005.03.004
- Bliss, C.I., 1939. The toxicity of poisons applied jointly. *Annals of Applied Biology* 26, 585–615. doi:10.1111/j.1744-7348.1939.tb06990.x
- Boman, A., Maibach, H.I., 2000. Influence of Evaporation and Solvent Mixtures on the Absorption of Toluene And n-butanol in Human Skin in

- Vitro. *Annals occupational Hygiene* 44, 125–135. doi:10.1093/annhyg/44.2.125
- BRASIL. **Portaria nº 2914**. Ministério da saúde. Brasília, 12 de dezembro de 2011.
- BRASIL. Resolução **CONAMA nº 357**. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Brasília, 17 de março de 2005.
- BRASIL. Resolução **CONAMA nº 393**. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Brasília, 8 de agosto de 2007.
- BRASIL. **Resolução CONAMA nº 396**. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Brasília, 03 de agosto de 2008.
- BRASIL. **Resolução CONAMA nº 430**. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Brasília, 16 de maio de 2011.
- Buczynska, A.J., Krata, A., Stranger, M., Godoi, A.F.L., Kontozova-Deutsch, V., Bencs, L., Naveau, I., Roekens, E., Grieken, R.V., 2009. Atmospheric BTEX-concentrations in an area with intensive street traffic. *Atmospheric Environment* 43, 311–318. doi:10.1016/j.atmosenv.2008.09.071
- Castro, I.B., Westphal, E., Fillmann, G., 2011. Tintas anti-incrustantes de terceira geração: Novos biocidas no ambiente aquático. *Química Nova* 34, 1021–1031. doi:10.1590/S0100-40422011000600020
- Coquelet, C., Valtz, A., Richon, D., 2008. Solubility of ethylbenzene and xylene in pure water and aqueous alkanolamine solutions. *The Journal of Chemical Thermodynamics* 40, 942–948. doi:10.1016/j.jct.2008.01.021
- Correa, M., García, H.I., 1990. Physiological responses of juvenile white mullet, *Mugil curema*, exposed to benzene. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 44, 428–434. doi:10.1007/BF01701225
- Corseuil, H.X., Fernandes, M., 1999. Efeito do etanol no aumento da solubilidade de compostos aromáticos presentes na gasolina brasileira. *Revista Engenharia Sanitária e Ambiental* 4, 71–75.
- Dange, A.D., Masurekar, V.B., 1981. Toluene toxicity: Effects of sublethal levels on enzyme activities in seawater adapted tilapia (*Sarotherodon mossambicus* Peters). *Journal of Biosciences* 3, 129–134. doi:10.1007/bf02702655
- de Paiva Magalhães, D., Ferrão-Filho, A., 2008. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecologia brasiliensis*, 12, 3.
- Di Marzio, W., Saenz, M.E., 2004. Quantitative structure–activity relationship for aromatic hydrocarbons on freshwater fish. *Ecotoxicology and environmental safety* 59, 256–262. doi:10.1016/j.ecoenv.2003.11.006
- Ferraz, M.A., Choueri, R.B., Fiori, E.F., Nobre, C.R., Cesar, A., Pereira, C.D.S., 2012. Avaliação da qualidade dos sedimentos da orla de Santos empregando-se ensaios de toxicidade e caracterização da estrutura da comunidade macrobentônica. *O Mundo da Saúde, São Paulo* 36, 625–634.
- Ferreira, A.L.G., Loureiro, S., Soares, A.M.V.M., 2008. Toxicity prediction of binary combinations of cadmium, carbendazim and low dissolved oxygen on *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology* 89, 28–39. doi:10.1016/j.aquatox.2008.05.012
- Figuerêdo, L.P. de, Nilin, J., Silva, A.Q. da, Damasceno, É.P., Loureiro, S., Costa-Lotufo, L.V., 2016a. Zinc and nickel binary mixtures act additively on the tropical mysid

- Mysidopsis juniae. Marine and Freshwater Research 67, 301–308. doi:10.1071/mf14363
- Figuerêdo, L.P. de, Nilin, J., Silva, A.Q. da, Loureiro, S., Costa-Lotufo, L.V., 2016b. Development of a short-term chronic toxicity test with a tropical mysid. Marine Pollution Bulletin 106, 104–108. doi:10.1016/j.marpolbul.2016.03.020
- Finotti, A.R., Teixeira, C.E., Fedrizzi, F., Calgliari, J., Nascimento Filho, I.D., 2009. Evaluation of the ethanol influence over the volatilization grade of BTEX in soil impacted by gasoline/ethanol spills. Engenharia Sanitaria e Ambiental, 14, 443–448.
- Forte, E.J., Azevedo, M.S., de Oliveira, R.C., de Almeida, R., 2007. Contaminação de aquífero por hidrocarbonetos: estudo de caso na Vila Tupi, Porto Velho-Rondônia. Química Nova, 30, 1539–1544.
- Gabardo, I.T., 2007. Caracterização química e toxicológica da água produzida descartada em plataformas de óleo e gás na costa brasileira e seu comportamento dispersivo no mar. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN 235p.
- Gebara, S.S., Ré-Poppi, N., Nascimento, A.L.C.S. do, Junior, J.L.R., 2013. Métodos para análises de HPA e BTEX em águas subterrâneas de postos de revenda de combustíveis: um estudo de caso em Campo Grande, MS, Brasil. Química Nova 36, 1030–1037. doi:10.1590/s0100-40422013000700018
- Gomes, E. A., 2009. Tratamento combinado da água produzida de petróleo por eletroflotação e processo fenton. Dissertação de Mestrado. Universidade Tiradentes 84p.
- Gschwend, P.M., Macfarlane, J.K., 1986. Polybrominatedmethanes: A yearround study of their release to seawater from two furoid algae: *Ascophyllum nodosum* and *Fucus vesiculosus*, Zn Organic marine geochemistry, 314–322.
- Heleno, F.F., Lima, A.C., Afonso, R.J.C.F., Coutrim, M.X., 2010. Otimização e validação de métodos analíticos para determinação de BTEX em água utilizando extração por headspace e microextração em fase sólida. Química Nova 33, 329–336. doi:10.1590/s0100-40422010000200019
- Herman, D.C., Mayfield, C.I., 1990. Impact of volatile aromatic hydrocarbons, alone and in combination, on growth of the freshwater alga *Selenastrum capricornutum*, Aquatic Toxicol 18, 87–100. doi:10.1016/0166-445X(90)90020-P
- Hutchinson, T.H., Shillabeer, N., Winter, M.J., Pickford, D.B., 2006. Acute and chronic effects of carrier solvents in aquatic organisms: A critical review. Aquatic Toxicology 76, 69–92. doi:10.1016/j.aquatox.2005.09.008
- ITOPF - International Tanker Owners Pollution Federation. 2017. Accidental Tanker Oil Spill Statistics. International Tanker Owners Pollution Federation Ltd., London.
- Jardim, I.C.F.S., 2010. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. Scientia Chromatographica 2, 13–25.
- Jonker, M.J., Svendsen, C., Bedaux, J.J.M., Bongers, M., Kammenga, J.E., 2005. Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level-dependent, or dose ratio-dependent effects in mixture dose-response analysis. Environmental Toxicology and Chemistry 24, 2701–2713. doi:10.1897/04-431r.1
- Knauss, K.G., Copenhaver, S.A., 1995. The solubility of p-xylene in water as a function of temperature and pressure and calculated thermodynamic quantities. Geochimica et Cosmochimica Acta 59, 2443–2448. doi:10.1016/0016-7037(95)00138-7
- Kolesnikovas, C., Oliveira, E., Duarte, U., 2009. Avaliação de risco toxicológico parahidrocarbonetos totais de petróleo em forma fracionada aplicada à gestão e

- monitoramento de água subterrânea em um complexo industrial. *Águas Subterrâneas* 23, 31-44.
- Li, X., Zhou, Q., Luo, Y., Yang, G., Zhou, T., 2013. Joint action and lethal levels of toluene, ethylbenzene, and xylene on midge (*Chironomus plumosus*) larvae. *Environmental Science and Pollution Research* 20, 957–966. doi:10.1007/s11356-012-1264-7
- Link, J.S., Bolles, K. & Milliken, C.G. 2002. The feeding ecology of flatfish in the Northwest Atlantic. *Journal of Northwest Atlantic Fishery* 30, 1–17. doi:10.2960/J.v30.a1
- Loewe, S., Muischnek, H., 1926. Combined effects I Announcement - Implements to the problem. *Naunyn-Schmiedeberg's Archiv für Experimentelle Pathologie und Pharmakologie* 114, 313–326.
- Loureiro, S., Svendsen, C., Ferreira, A.L.G., Pinheiro, C., Ribeiro, F., Soares, A.M.V.M., 2010. Toxicity of three binary mixtures to *Daphnia magna*: Comparing chemical modes of action and deviations from conceptual models. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29, 1716–1726. doi:10.1002/etc.198
- Marchini, S., Hoglund, M.D., Borderius, S.J., Tosato, M.L., 1993. Comparison of the Susceptibility of Daphnids and Fish to Benzene Derivatives. *Science Total Environmental* 134, 799–808. doi:10.1016/S0048-9697(05)80085-3
- Martinez, C.B.R., Suiadican, S.O., Ferroni, E.N., Moreira, G.S., 1992. Effect of benzene on the swimming activity of *Mysidopsis juniae* (Crustacea, Mysidacea). *Environmental Science and Pollution Research* 25, 487–490.
- Martins, C.R., Lopes, W.A., Andrade, J.B. de, 2013. Solubilidade das substâncias orgânicas. *Química Nova* 36, 1248–1255. doi:10.1590/s0100-40422013000800026
- Masten, L.W., Boeri, R.L., Walker, J.D., 1994. Strategies employed to determine the acute aquatic toxicity of ethyl benzene, a highly volatile, poorly water-soluble chemical. *Ecotoxicology and environmental safety* 27, 235–248. doi:10.1006/eesa.1994.1027
- Mauchline, J., 1980. The biology of mysids and euphausiids, in: Blaxter, J., Russel, F., Young, M., *Advances in Marine Biology*. London: Academic Press, pp.68.
- Menghini, L.N., Da Silva, M.N., Cariús, R., Vidal, C.B., Raulino, G.S.C., Milhome, M.A.L., Do Nascimento, R.F., 2014. Validação de metodologia para análise de BTEX em água produzida por cromatografia a gás acoplado a espectrômetro de massas usando extração por headspace. *Revista Analytica* 70, 83–86.
- Miller, D.J., Hawthorne, S.B., 2000. Solubility of Liquid Organics of Environmental Interest in Subcritical (Hot/Liquid) Water from 298 K to 473 K. *Journal of Chemical & Engineering Data* 45, 78–81. doi:10.1021/jc990190x
- Miri, M., Shendi, M.R.A., Ghaffari, H.R., Aval, H.E., Ahmadi, E., Taban, E., Gholizadeh, A., Aval, M.Y., Mohammadi, A., Azari, A. 2016. Investigation of outdoor BTEX: Concentration, variations sources, spatial distribution, and risk assessment. *Chemosphere*, 163, 601-609.
- Miyashita, L.K., Calliari, D., 2014. Revision of mysids (Crustacea: Peracarida: Mysida) zoogeographical distribution in the south-west Atlantic (08 to 40S). *Marine Biodiversity Records* 7, 1–13.
- Mizell, M., Romig, E.S., 2002. The aquatic vertebrate embryo as a sentinel for toxins: zebrafish embryo dechoriation and perivitelline space microinjection. *International Journal of Developmental Biology* 41, 411–423.

- MMA – Ministério do Meio Ambiente. 2006. Plano Nacional de Recursos Hídricos. MMA, Brasília, 4vol.
- Nakane, Y., Suda, Y., Sano, M. 2011. Food habits of fishes on an exposed sandy beach at Fukiagehama, South-West Kyushu Island, Japan. *Helgoland Marine Research* 65, 123–131. doi:10.1007/s10152-010-0208-1
- Nicodemo, S.C.T.S., 2010. Diagnóstico ecotoxicológico dos efluentes lançados no complexo estuarino do Jundiá/Potengi, Natal-RN. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN 96p.
- Okumura, Y., Koyama, J., Takaku, H., Satoh, H., 2001. Influence of organic solvents on the growth of marine microalgae. *Archives of Environmental Contamination Toxicology* 41, 123–128. doi:10.1007/s002440010229
- Oliveira, L.L.D., 2014. Biomarcadores enzimáticos e testes ecotoxicológicos na avaliação da toxicidade de fármacos em invertebrados aquáticos. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo-USP, 279p.
- Oliveira, R.C.G., Oliveira, M.C.K., 2000. Remoção de contaminantes tóxicos de efluentes líquidos oriundos da atividade de produção de petróleo no mar. *Boletim técnico Petrobrás*, Rio de Janeiro 43, 129–136.
- Olmstead, A.W., Leblanc, G.A., 2005. Toxicity assessment of environmentally relevant pollutant mixtures using a heuristic model. *Integrated Environmental Assessment and Management* 1, 114–122. doi:10.1897/IEAM_2004-005R.1
- Ortega-Salas, A.A., Núñez-Pastén, A., Camacho, M.H.A., 2008. Fecundity of the crustacean *Mysidopsis californica* (Mysida, Mysidae) under semi-controlled conditions. *Revista de Biología Tropical* 56, 535–539.
- Pavlaki, M.D., Pereira, R., Loureiro, S., Soares, A.M.V.M., 2011. Effects of binary mixtures on the life traits of *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 99–110. doi:10.1016/j.ecoenv.2010.07.010
- Peng, C., Lee, J.-W., Sichani, H.T., Ng, J.C., 2015. Toxic effects of individual and combined effects of BTEX on *Euglena gracilis*. *Journal of Hazardous Materials* 284, 10–18. doi:10.1016/j.jhazmat.2014.10.024
- Pestana, J.L.T., Loureiro, S., Baird, D.J., Soares, A.M.V.M., 2009. Fear and loathing in the benthos: Responses of aquatic insect larvae to the pesticide imidacloprid in the presence of chemical signals of predation risk. *Aquatic Toxicology* 93, 138–149. doi:10.1016/j.aquatox.2009.04.008
- Pestana, J.L.T., Loureiro, S., Baird, D.J., Soares, A.M.V.M., 2010. Pesticide exposure and inducible antipredator responses in the zooplankton grazer, *Daphnia magna* Straus. *Chemosphere* 78, 241–248. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.10.066
- Resgalla, J.R.C., Noldin, J., Tamanaha, M., Deschamps, F., Eberhardt, D., Rörig, L., 2007. Risk analysis of herbicide quinclorac residues in irrigated rice areas, Santa Catarina, Brazil. *Ecotoxicology* 16, 565–571. doi:10.1007/s10646-007-0165-x
- Ribeiro, E.A., 2007. Efeitos de concentrações subletais dos hidrocarbonetos poliaromáticos específicos BTX (benzeno, tolueno e xileno) no peixe *Sphoeroidestudineus* (Linnaeus, 1758) através de biomarcadores bioquímicos e histológicos. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Paraná – UFPR 61p.
- Ruppert, E.E., Fox, R.S., Barnes, R.D., 2005. Zoologia dos invertebrados. 7ª ed. São Paulo: Roca.

- Sada, E., Kito, S., Ito, Y., 1975. Solubility of Toluene in Aqueous Salt Solutions. *Journal of Chemical and Engineering Data* 20, 373–375. doi:10.1021/jc60067a030
- Santos, P.V., 2012. Impactos ambientais causados pela perfuração de petróleo. *Cadernos de Graduação-Ciências Exatas e Tecnológicas*, 1, 153–163.
- Shadi, A., Mazandarani, M.K., Nikpour, Y., 2012. Concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) in sediments of Khowre-Musa System (Persian Gulf). *World*, 4, 83–86.
- Silva, F.L. do N., Jr., J.R. dos S., Neto, J.M.M., Silva, R.L.G. do N.P. da, Flumignan, D.L., Oliveira, J.E. de, 2009. Determinação de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos em gasolina comercializada nos postos do estado do Piauí. *Química Nova* 32, 56–60. doi:10.1590/s0100-40422009000100011
- Solomons, T.W., Fryhle, C.B., 2009. *Química orgânica*. 9ª ed. LTC Rio de Janeiro.
- Stergiou, K.I., Karpouzi, V.S., 2002. Feeding habits and trophic levels of Mediterranean fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 11, 217–254. doi:10.1023/A:1020556722822
- Takahashi, K., Hirose, T., Kawaguchi, K., 1999. The importance of intertidal sandburrowing peracarid crustaceans as prey for fish in the surf-zone of a sandy beach in Otsuchi Bay, northeastern Japan. *Fisheries Science* 65, 856–864. doi:10.2331/fishsci.65.856
- Teuschler, L.K., Gennings, C., Hartley, W.R., Carter, H., Thiyagarajah, A., Schoeny, R., Cubbison, C., 2005. The interaction effects of binary mixtures of benzene and toluene on the developing heart of medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere* 58, 1283–1291. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.09.075
- Tiburtius, E.R.L., Peralta-Zamora, P., Leal, E.S., 2004. Contaminação de águas por BTXs e processos utilizados na remediação de sítios contaminados. *Química Nova* 27, 441–446. doi:10.1590/s0100-40422004000300014
- Tosato, M.L., Pino, A., Passerini, L., Marchini, S., Viganò, L., Hoglund, M.D., 1993. Updating and validation of a daphnia toxicity model for benzene derivatives. *Science of The Total Environment* 134, 1479–1490. doi:10.1016/s0048-9697(05)80153-6
- Vasconcelos, T.L., Barbosa, C.C.A., Valdevino, D.S., De Sá, L.A.C.M., 2010. Cartas de sensibilidade ambiental ao derramamento de óleo e sua distribuição no Brasil. III Simpósio Brasileiro de Ciências Geodésicas e Tecnologias da Geoinformação.
- Vaz, C., Kleine, T., Tortelli, T.S., Böhm, R.F.S., Spitzner, E.C., Gonçalves, R.A., Barros, V.G., Simm, M., De Oliveira, T.M.N., Matias, W.G., 2013. Assessment of chronic toxicity in water samples from the Babitonga bay - south of Brazil - using transgenerational testing with *Mysidopsis juniae*. *Fresenius Environmental Bulletin* 22, 1967–1976.
- Vieira, F.C.S., 2004. Toxicidade de Hidrocarbonetos Monoaromáticos do Petróleo sobre *Metamysidopsis elongata atlantica* (Crustacea, Mysidacea). Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina 72p.
- Xuefeng, L., Luo, Y., Yang, G., Zhou, T., 2013. Joint action and lethal levels of toluene, ethylbenzene, and xylene on midge (*Chironomus plumosus*) larvae. *Environmental Science and Pollution Research* 20, 957–966. doi:10.1007/s11356-012-1264-7

APÊNDICE 1

Tabela com resumo dos efeitos da mistura binária do tolueno, xileno e benzeno na letalidade do misidáceo *M. juniae*. **A. Mistura binária do xileno e tolueno. B. Mistura binária do xileno e benzeno. C. Mistura binária do tolueno e benzeno.**

A.

	Concentração de Adição			
	Referencia	S/A	DR	DL
Max	0,9255965	0,863055	0,857871	0,862284
Beta (xil)	0,89677108	6,258828	2659,487	9,478757
beta (tol)	11,2270864	13,12364	276,6167	15,48357
EC₅₀ (xil)	75,8134309	16,45895	19,99494	16,98118
EC₅₀ (tol)	44,5460643	43,71108	40,04115	43,98371
A	-	2,096189	6,598873	0,011118
B xil	-	-	-9,5274	-
B tol	-	-	-	-111,89
SS	104,485107	86,00872	39,4737	84,01139
R²	0,29885587	0,422841	0,735113	0,436244
X²	44,5357623			
Df		1	2	2
p (x²)	4,9652E-09	1,72E-05	7,64E-15	3,58E-05

B.

	Referência	Concentração de Adição			Referência	Ação Independente		
		S/A	DR	DL		S/A	DR	DL
Max	0,87302974	0,872716	0,872739	0,873456	0,8713438	0,874372	0,871344	0,872401
beta (xil)	14,0000852	4316,754	4316,754	4312,534	819,10712	819,1069	819,1071	819,0806
beta (ben)	5,20630806	12,75012	12,69788	11,2781	15,257961	12,59311	15,25796	10,16897
EC₅₀ (xil)	451,182647	48,62638	47,36762	55,63358	38,289415	38,22045	38,28941	38,21914
EC₅₀ (ben)	104,571295	83,26383	83,27645	83,66112	83,65235	83,13445	83,65235	84,13579
A	-	2,150447	2,098025	3,422467	-	1,536078	7,513525	21,54408
B xil	-	-	0,207332	-	-	-	-15,2036	-
B bem	-	-	-	0,274227	-	-	-	2,639827
SS	50,3626726	39,74036	39,73972	39,57424	45,533052	45,16136	43,66911	40,33571
R²	0,27591455	0,428636	0,428645	0,431024	0,345352	0,350696	0,372151	0,420076
X²	19,1908204	-	-	-	24,020441	-	-	-
Df	-	1	2	2	-	1	2	2
p (x²)	0,00072092	0,001117	0,004935	0,004543	7,912E-05	0,542083	0,393778	0,074372

C.

	Referência	Concentração de Adição		
		S/A	DR	DL
Max	0,918948	0,98	0,872057	0,6725244
beta (tol)	3,139709	1,515932	5962,073	5962,07267
beta(ben)	18,44696	21,75265	32,41	34,0656711
EC₅₀ (tol)	63,38991	89,56553	49,9982	50,0026788
EC₅₀(ben)	76,81494	77,02545	80,2623	82,1221322
A	-	0,847496	2,321165	-2,3211652
B tol	-	-	7,370533	-
B bem	-	-	-	7,37053342
SS	91,74918	89,45075	38,53563	222,996784
R²	0,613485586	0,623168	0,83766	0,06057503
X²	145,6266518	-	-	-
Df	-	1	2	2
p (x²)	1,7608E-30	0,129505	2,78E-12	0,004543